

10/019995

PCT/JP 99/04088

20.08.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

| |
|-------------------|
| REC'D 08 OCT 1999 |
| WIPO PCT |

JP99/04088

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 5月11日

EKU

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第130395号

出 願 人
Applicant(s):

和研薬株式会社

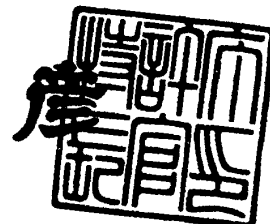
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 9月24日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3064153

【書類名】 特許願

【整理番号】 DP99-1028

【提出日】 平成11年 5月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 21/00

【発明の名称】 無細胞タンパク質合成手段

【請求項の数】 13

【発明者】

 【住所又は居所】 愛媛県松山市朝美1丁目5番3号

 【氏名】 遠藤 弥重太

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県草津市下笠町字辻出945番地1 和研薬株式会社 草津センター内

 【氏名】 西川 茂道

【特許出願人】

 【識別番号】 591106680

 【氏名又は名称】 和研薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

 【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 067070

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 無細胞タンパク質合成手段

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 無細胞タンパク質合成系において、該合成系に用いる反応槽が分子篩可能な担体によって調製され、無細胞タンパク質合成系に關与する材料物質が該担体を移動相として展開され、展開中に無細胞タンパク質合成反応が実行され、その結果として、合成タンパク質を回収することが可能な無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 2】 カラムクロマトグラフィーの原理を応用する請求項 1 に記載の無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 3】 無細胞タンパク質合成系に關与する合成基質、エネルギー源、無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分から選ばれる物質が、分子篩可能な担体の移動相において均一に分散状態におかれうる請求項 1 又は 2 に記載の無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 4】 無細胞タンパク質合成系に關与する無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を、分子篩可能な担体に充填し、該担体の移動相において、翻訳鑄型物質、無細胞タンパク質合成系に關与する合成基質、エネルギー源、無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分との反応によって、連続的にタンパク質合成が履行されうる請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 5】 無細胞タンパク質合成用細胞抽出物が、自己のタンパク質合成反応の阻害に關与する系を排除することによって調製された無細胞合成用細胞抽出物である請求項 4 に記載の無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 6】 無細胞タンパク質合成用細胞抽出物が、無細胞タンパク質合成系に關与する合成基質とエネルギー源と無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分から選ばれる物質と配合され、要時、溶解可能な製剤として調製され、この溶解組成物を、分子篩可能な担体に翻訳鑄型物質と共に／又は順次充填し、担体の移動相において無細胞タンパク質合成が履行されうる請求項 1 又は 2 に記載の無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 7】 無細胞タンパク質合成用細胞抽出物が、胚芽由来である請求項

4～6のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 8】合成タンパク質、合成副産物、無細胞タンパク質合成系に関与する材料物質が、分子篩の原理によりカラム内を分別的に展開可能な請求項 1～7のいずれかに記載の記載の無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 9】無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の充填、翻訳鋳型物質の充填、合成基質の充填、エネルギー源の充填、無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分の充填が、選択的に自動制御下におかれ、分子篩の原理によりカラム内を分別的に自動制御下展開され、展開中に無細胞タンパク質合成が履行されることが可能な請求項 1～8のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 10】合成されたタンパク質が、自動制御下回収される工程が導入された請求項 9に記載の無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 11】請求項 1～10のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成手段を利用したタンパク質の製造方法。

【請求項 12】請求項 1～10のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成手段の適用に適した装置。

【請求項 13】請求項 1～10のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成手段の適用に適した装置と試薬をセットとして調製したキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質の合成手段に関連し、詳しくはその手段を利用したタンパク質の合成方法・装置・キットに係る。本発明は、無細胞タンパク質合成用反応を、分子篩の原理を応用する系にておこなうことを特徴とするものである。

【0002】

【従来の技術】

従来、無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質の合成方法は、ペプチド合成反応速度と翻訳反応の正確性においては生細胞に匹敵する性能を保持しているものの、合成効率が生細胞のその 0.1～1%以下と低く、反応時間も 1 時間

以内と短いため、タンパク質の生産性が低いという欠点があった。

【0003】

今日、利用されている無細胞タンパク質合成系は、大腸菌、コムギ胚芽や家兎網状赤血球由来の系が主流で市販もされているが、いずれもタンパク質合成効率が低いという欠点から、放射性同位体標識法や免疫学的方法と組み合わせて遺伝子翻訳産物の分析手段としての利用に限られ、タンパク質の調製手段としては殆ど利用されていない。

【0004】

これまで、無細胞タンパク質合成系の効率化に関して多くの研究がなされてきたが、スピリン (A. S. Spirin) らは、従来の方法で調製した無細胞タンパク質合成系に、合成基質であるアミノ酸と、エネルギー源であるATP、GTPを限外ろ過膜を介して連続的に供給することによって(連続式無細胞タンパク質合成系)、上記いずれの無細胞タンパク質合成系においても反応時間を20時間以上にわたって持続させることに成功し、従来の20倍を越えるタンパク質合成収量を達成した (A. S. Spirin et al., (1988), Science, 242, 1162-1164)。

【0005】

一般に無細胞タンパク質合成反応液におけるリボソームなどタンパク質合成因子の濃度は、生細胞中に比べて10%前後と低いが、横山らは濃縮した大腸菌抽出液を含む反応液を透析膜を用いる連続式無細胞タンパク質合成を試み、CATやRasなど比較的小分子のタンパク質を反応系1ml当たり3-5mgの高収量で合成することに成功している (木川ら、第21回日本分子生物学会、WID6) (Kigawa, T. et al., FEBS Lett. 442, 15-19, 1999)。

【0006】

これらの成果は、基質濃度の低下が、無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質合成効率低下現象の一因であることを示している。言い換えると、連続式無細胞タンパク質合成系による効率化は、アミノ酸やエネルギー源の低下を防ぐ(反応中の基質濃度低下には混在するそれら基質の代謝酵素群も関与すると考えら

れる)と同時に、AMPやGMPなどの代謝産物の蓄積を排出除去することにより、タンパク質合成効率が上昇した結果であると説明できる。

【0007】

従来の連続式無細胞タンパク質合成装置としては、限外ろ過膜法、透析膜法や樹脂に翻訳鋳型を固定化したカラムクロマト法等 (Spirin, A. et al. (1993) Meth. in Enzymol., 217, 123-142) を挙げることができる。なかでも、限外ろ過膜法と透析膜法は取り扱いが簡便なため、汎用されている。本発明者等も、合成効率の高い無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を調製する方法を発明し、透析膜法をもちいた連続式無細胞タンパク質合成を試み反応容量 1 ml 当たり 4 mg 程度のジヒドロ葉酸還元酵素の合成に成功している。

【0008】

しかし、これらの膜を用いる連続式無細胞タンパク質合成法には、使用する膜の材質強度、目詰まりによる機能性の低下等の欠点があり、数ミリリットルの小規模のタンパク質合成には適しているものの、タンパク質の大量生産を目的とする大容量の無細胞タンパク質合成反応装置に応用することは困難であった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、生産性、生産量、及び簡便性を改善した無細胞タンパク質合成手段を提供し、その手段を利用した無細胞タンパク質合成方法、装置、およびキットを提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、無細胞タンパク質合成用の反応槽の担体として、分子篩の原理を応用することにより、膜を使用した連続式無細胞タンパク質合成法で生じていた材質強度や目詰まりによる機能低下等の問題が改善され、且つ、大容量の装置に利用できることを見出した。

すなわち、本発明は分子篩の原理を応用した無細胞タンパク質合成方法と、無細胞タンパク質合成用の反応槽を備えた無細胞タンパク質合成反応装置と、それ

らに利用するキットを提供するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の分子篩の原理を応用する無細胞タンパク質合成手段について詳細に説明する。

【0012】

本発明の無細胞タンパク質合成系とは、大腸菌、胚芽、家兎網状赤血球等の既知の系が適用可能である。好ましい系は、胚芽であり、コムギ、大麦、いね、コーン、及びほうれん草等が利用できる。この原料は、自体公知の方法によって、無細胞タンパク質合成材料つまり無細胞タンパク質合成用細胞抽出物として調製される (Johnston, F. B. et al. (1957) Nature, 179, 160-161) が、より好ましくは、自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系が排除されていることである。

【0013】

無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の、自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することとは、原料細胞自身が含有する又は保持する自己タンパク質の合成を制御する手段を除くことを意味する。特に、本発明者が見出したこの関与する系を排除することとは、リボソームに作用してその機能を抑制する物質の排除を意味する。

【0014】

原料細胞自身が含有する又は保持するタンパク質合成機能を抑制する物質とは、例えば種子の胚乳に大量に局在することが知られている、リボソームの機能を抑制するトリチン (Massiah, A. J., and Hartely, M. R. (1995) Planta, 197, 633-640)、チオニンとよばれるシステインを多く含むタンパク質 (Brummer, J., Thole, H. and Kloppstech, K. (1994) Eur. J. Biochem, 219, 425-433)、リボヌクレアーゼ (Matsushita S., Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ., No. 19, 1~) 等である。

【0015】

胚芽の単離段階で混入する、胚乳局在性の胚芽無タンパク質合成抑制（阻害）タンパク質の一群、たとえば、トリチン、チオニン、リボヌクレアーゼ等を完全に胚芽試料から排除することによって、タンパク質合成活性の抑制を解除することができる。

【0016】

自己タンパク質の合成を制御する手段を除くための有用な手段は、界面活性剤特に非イオン性の界面活性剤をもちいて原料細胞を処理することである。非イオン性の界面活性剤であるかぎり、広く利用ができるが、好適なものとしては、ポリオキシエチレン誘導体である、ブリッジ（B r i j）、トリトン（T r i t o n）、ノニデット（N o n i d e t）P40、ツイーン（T w e e n）等が例示される。なかでも、ノニデット（N o n i d e t）P40が最適である。その添加量は、例えば0.5%である。

【0017】

処理は、原料細胞を、例えばコムギ胚芽を使った場合、既知の手段でミル・浮選・篩の工程によって、胚芽抽出物を回収する。この胚芽抽出物に対して界面活性剤による洗浄を数回おこない、洗浄液が白濁しなくなるまで、洗浄を行う。この処理は、超音波処理との組合せでおこなうことがより好ましく、より完全な効果をうることができる。かくして、本発明の一実施態様として、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物が調製される。

【0018】

本発明は、無細胞タンパク質合成系に用いる反応槽が、分子篩可能な担体によって調製されうる。この担体としては、分画分子量が10,000以下のものに適したものであれば特に限定されない。担体材料は、例えば多孔性ゲルろ過粒子であり、具体的にはセファデックスG10からG25等が例示される。担体は、水によって、調製してもよいが、より好ましくは緩衝液によって平衡化して使うことが好ましい。担体は、予め反応槽内に充填して調製されてもよいし、要時調整型で、反応槽と別々にセットとして調製してもよい。

【0019】

反応槽は、クロマトグラフィー好ましくはカラムクロマトグラフィーが履行できるものであることが好ましい。カラム径、カラム長、担体ボリュームは、反応時間・展開速度との組合せによって、適宜調整できる。反応槽のボリュームは、目的タンパク質の合成量に応じて、適宜選択可能である。反応槽は、担体を事前充填し、所望により無細胞タンパク質合成系に関与する材料物質を担体中に分散させたものを調製するためには、要時開放可能な少なくとも2つの開口を担持したものが適当である。

【0020】

反応槽に、担体を充填することは、要時若しくは事前充填可能であるが、無細胞タンパク質合成系に関与する材料物質、特に合成基質例えばアミノ酸や、エネルギー源例えばATP、GTP、クレアチンリン酸、所望により添加する無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分は、充填担体中に均一に、より好ましくは、これら物質の担体の移動相での展開と別途充填される無細胞タンパク質合成用細胞抽出物及び／又は翻訳鋳型物質の展開速度との関係を考慮した反応効率を計算し、最適の分散状態、特に局在的均一分散をおこなうことが望ましい。

【0021】

ここで、所望により、担体は分子篩担体のみで構成し、別途、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物、合成基質、エネルギー源、所望により無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分を、適宜選択して事前調製した製剤を、要時、担体に充填し、翻訳鋳型物質を充填し、展開し、無細胞タンパク質合成をおこなうことも可能である。

【0022】

分子篩可能な担体における、移動相の展開速度は、カラムのサイズや合成効率によって決定されるが、一般的には1時間当たり、カラム内容量の1/10～1/30である。展開に利用する溶液は、合成基質例えばアミノ酸や、エネルギー源例えばATP、GTP、クレアチンリン酸、所望により添加する無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分を含む溶液であるが、必ずしも限定されない。また、展開は、好ましくは、自動制御されたものが望ましいが、必ずしも限定されない。

【0023】

合成反応は、担体を充填した反応槽内で行うことが好ましい。しかし、充填条件を考慮すれば、担体上澄み中で、又はバッチによって反応をおこし、その後さらに担体展開中に合成反応をおこなうことも可能である。

【0024】

本発明の合成反応は、リボソームのような無細胞タンパク質合成用細胞抽出物用細胞抽出物が移動相として移動し、合成反応により精製する副産物が分別的に展開されることで、分離除去され、同時に至適濃度の合成基質やエネルギー源、及び各種イオン等、翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質の供給の下に、最大反応速度で合成が進行することが特徴である。

【0025】

本発明の手段は、無細胞タンパク質合成系に関与する材料物質の充填・展開・そして合成タンパク質の回収を、自動制御化して実施可能である。自動化は、所望により、工程単位ごとに制御できるが、より好ましくは、移動相の液展開速度が自動制御されていることがもっとも重要である。

【0026】

本発明の手段は、各種のイオン交換カラムやアフィニティークラム等、目的とするタンパク質に応じて自体公知の精製手段を連結することによって、大量のタンパク質を高純度で連続的に回収することが可能である。

【0027】

かくして、上記に説明された本発明の手段をもちいれば、目的とするタンパク質を効率的に製造する方法を提供可能である。

【0028】

さらに、上記に説明された本発明の手段をもちいれば、目的とする無細胞タンパク質合成用の装置を提供可能である。

【0029】

さらに加えるに、上記に説明された本発明の手段をもちいれば、目的とする無細胞タンパク質合成に適したセットからなるキットを提供可能である。

【0030】

以下、本発明をコムギ胚芽抽出液を使用した無細胞タンパク質合成系を用いた参考例、実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

【0031】

【参考例1】

コムギ胚芽抽出液の調製

ミル、浮選、篩いを用いる種子から無傷（発芽能を有する）の単離方法はJ o h n s t o nらの方法（J o h n s t o n, F. B. e t a l. (1957) N a t u r e, 179, 160-161）を改良して用いた。北海道産のチホクコムギ種子（未消毒）を1分間に100gの割合でミル（F r i t s c h社製R o t o r S p e e d M i l l p u l v e r i s e t t e 14型）に添加し、回転数8,000rpmで種子を温和に破碎した。これを再度6,000rpmで破碎し、篩いで粗胚芽画分（メッシュサイズ0.71mm-1.00mm）を得た後、四塩化炭素とシクロヘキサン混液（四塩化炭素：シクロヘキサン＝2.5：1）を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を浮上画分から回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した。

【0032】

この胚芽画分に混在する種皮等の不純物をポリエチレン板などの静電気帯電体を用いて吸着除去した。さらに胚芽粒子を篩と静電気帯電体を用いて、小粒（0.71mm～0.85mm）、中粒（0.85mm～1mm）、軽粒（0.85mm～1mmで且つ軽量）の3画分に分別した。小粒画分が最も高いタンパク質合成活性を示した。軽粒は、種子破碎時に胚芽に生じた小傷胚芽が浮選操作中に破壊が進行したものであると推察される。次に、この試料からコムギ胚乳成分を完全に除去するため、非イオン性界面活性剤であるNP40の0.5%溶液に懸濁し、超音波洗浄器を用いて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄を繰り返した。蒸留水の存在下に再度1回の超音波洗浄を行い、コムギ胚芽を純化した。

【0033】

コムギ胚芽抽出液の調製は常法（E r i c k s o n, A. H. e t a l. (

1996) Meth. in Enzymol., 96, 38-50) に準じた。以下の操作は4度摂氏で行う。液体窒素で凍結した純化コムギ胚芽を乳鉢中で粉碎し、得た粉体1g当たり、1mlのPattersonらの方法を一部改変した抽出溶液(80mM HEPES-KOH, pH7.8、200mM 酢酸カリウム、2mM 酢酸マグネシウム、4mM 塩化カルシウム、8mM ジチオスレイトール、各0.6mM L型アミノ酸20種類、各1μMのタンパク質分解酵素阻害剤であるFUT、E-64、PMSFを含む)を加えて、泡が発生しないように注意しながら攪拌した。

【0034】

30、000g、15分間の遠心によって得られる上清を胚芽抽出液として回収し、あらかじめ溶液(40mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、4mM ジチオスレイトール)で平衡化しておいたセファデックスG-25カラム(Coarse)でゲル濾過を行った。試料の濃度を、170~250A260nm (A260/A280=1.5)に調製した。

【0035】

【参考例2】

無細胞タンパク質合成反応液の調製

無細胞タンパク質合成反応液は、上記の方法で調製したコムギ胚芽抽出物を容量の20~60%含み、Ericksonらの方法に準じた以下の成分組成である、30mM HEPES-KOH, pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウム、2.85mM ジチオスレイトール、0.5mg/ml クレアチンキナーゼ、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mM クレアチンリン酸、0.380mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM)、0.05% NP-40を添加することにより調製した。この反応液に、既に報告した方法(Endo, Y. et al., (1992) J. Biotech., 25, 221-230)で調製したCAP付きジヒドロ葉酸還元酵素(dihydrofolate reductase)mRNA(80μg/ml反応容量)と50μCi(ml反応容量当たり)の

[U- 14 C]-ロイシン (leucine) (166 mCi/mmol) を添加した。

【参考例3】

コムギ胚芽抽出物の製剤化

参考例1又は2に記載した方法で得たコムギ胚芽抽出液を液体窒素で凍結後、通常の凍結乾燥機 (Labconco Freeze Dry System Freezone 4.5) を用いて3時間の運転で除水した。調製した粉末状の試料は、その成分が化学変化しないように2種の方法、真空及び窒素ガス充填下に封管して保存した。

【0036】

【実施例1】 ゲルろ過カラムクロマトを反応槽とするコムギ胚芽連続式無細胞タンパク質合成 (手動オープンカラム法)

ゲルろ過担体として、ファルマシア社製セファデックスG-25 (fine) を膨潤させた後、下記の成分組成である緩衝液 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 95 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、4 mM ジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチンリン酸、0.380 mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3 mM)、0.005% アジ化ナトリウム、0.05% NP-40、E-64、PMSF (各1 mM)) でカラムを平衡化し、カラム (内径10 mm、長さ100 mm) に詰めた。

【0037】

このカラムに、参考例に記載した方法で調整した無細胞タンパク質合成反応液0.1 ml (翻訳鋳型として5' CAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素mRNAを反応液1 ml当たり、80 μ g含む) を重層し、23度摂氏で1時間保温の後、アミノ酸、エネルギー源等合成に必要な成分をペリスタポンプを用いて、1時間当たり0.5 mlの流速で連続的に供給した。反応12時間後の試料1 μ lを12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、タンパク質を分離後、クマシーブリリアントブルーで染色し、更に、合成されたタンパク質の定量をデンストメーターによって行った (Endo, Y. et al., (1992

) J. Biotech., 25, 221-230, Endo, Y. et al., (1975) Biochim. Biophys. Acta, 383, 305-315)。

【0038】

結果は、図1Aに示した。レーン1は鋳型非存在、レーン3はカラム法で12時間合成した結果である。左のレーンは分子量マーカーで、上から、94kDa、67kDa、43kDa、30kDa、20.1kDa、14.4kDaである。矢印は合成されたジヒドロ葉酸還元酵素を示す。

【0039】

【実施例2】 ゲルろ過カラムクロマトを反応槽とするコムギ胚芽連続式無細胞タンパク質合成（液体クロマト装置）

ファルマシア社製セファデックスG-25 (fine) をゲルろ過担体とするカラム (HR10/30、内径10mm、長さ300mm) を使用し、ファルマシアバイオテックSMART^R System液体クロマト装置を利用し、反応容量を0.3mlとした以外は、反応液組成、反応方法、分析方法すべて、実施例1と同様に行った。結果は図1Bレーン2に示した。

【0040】

【比較例】 透析法を用いる連続式コムギ胚芽無細胞タンパク質合成

参考例に記載した方法で調製した無細胞タンパク質合成用反応液をデイスポダイライザー (Spectra/Por^R CE、MWCO: 25k、volume: 0.5ml) に入れ、反応液の10倍容量の透析外液 (20mM HEPES-KOH, pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウム、4mM ジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mM クレアチンリン酸、0.380mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3mM)、0.005% アジ化ナトリウム、0.05% NP-40、E-64、PMSF各1mM) に対しての透析系で、反応は摂氏23~30度で12時間おこなった。結果は図1Aのレーン2および図1Bのレーン1に示した。

【0041】

図1に示したように、カラム法によって、モデルとして用いたジヒドロ葉酸還元酵素を透析法と同様な合成収量（0.25mg/ml 反応容量）で生産できることが、手動オープンカラム法と液体クロマト装置を用いる両方法で実験的に確認された。カラムサイズを増大させることによって、タンパク質の大量生産が可能である。

【0042】

【発明の効果】

本発明の、無細胞タンパク質合成用の反応槽の担体として分子篩の原理を応用することにより、従来の膜を使用した連続式無細胞タンパク質合成法では難しかった大容量の無細胞タンパク質合成が可能となった。

【0043】

【図面の簡単な説明】

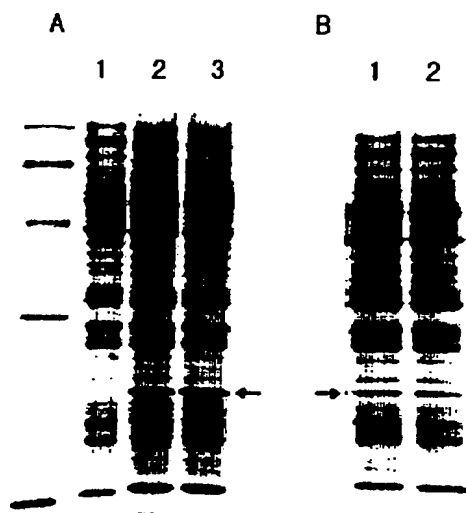
【図1】 （A）オープンカラムを利用した無細胞タンパク質合成の結果を示す図である。レーン1は鑄型非存在、レーン3はカラム法で12時間合成した結果である。レーン2は、比較例として従来の透析法を用いる連続式タンパク質合成法で同時間合成した結果を示す。左カラムは分子量マーカーで、上から、94kDa、67kDa、43kDa、30kDa、20.1kDa、14.4kDaである。矢印は合成されたジヒドロ葉酸還元酵素を示す。

（B）市販液体クロマト装置を利用した無細胞タンパク質合成の結果を示す図である。レーン1は、比較例である従来の透析法を用いる連続式タンパク質合成法で12時間合成した結果である。レーン2は液体クロマト装置を利用したタンパク質合成法で同時間合成した結果である。矢印は合成されたジヒドロ葉酸還元酵素を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

カラムを利用した無細胞タンパク質合成



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、生産性、生産量、及び簡便性を改善した無細胞タンパク質合成手段を提供し、その手段を利用した無細胞タンパク合成方法、装置、およびキットを提供することである。

【解決手段】 本発明の解決手段は、分子篩の原理を応用した無細胞タンパク質合成方法と、無細胞タンパク質合成用の反応槽を備えた無細胞タンパク質合成反応装置と、それらに利用するキットを提供するものである。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 1 1 0 6 6 8 0]

1. 変更年月日 1 9 9 1 年 4 月 1 8 日
[変更理由] 新規登録
住 所 京都府京都市左京区北白川西伊織町 2 5 番地
氏 名 和研薬株式会社

